

## Rapport du projet GANODIV : 28 Novembre 2011

**Caractérisation moléculaire de la biodiversité fongique et identification précoce des champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile, en particulier *Ganoderma boninense*.**

*Alba Zaremski ; Hubert de Franqueville ; Frédéric Breton*



*Photos : A. Zaremski-Mission Tanah-Gambus-2010*

### Liste de figures

- Figure 1. Photo de tissu de palmier à huile numéro 2 d'Indonésie (série 1)
- Figure 2. L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes.
- Figure 3 et 4. Obtention de mycélium pur de *Ganoderma* pour l'inoculât NJ3
- Figure 5. Développement de filaments mycéliens verts gris : *Penicillium*, *Alternaria tenuis*,....
- Figure 6. Envahissement complet de la boîte : *Mucor bienalis*,...
- Figure 7 et 8. *Ganoderma* dans la pépinière expérimentale et sur un palmier à huile de Tanah-Gambus.
- Figure 9. Produits de PCR du gel n° 09.
- Figure 10. Position phylogénétique d'espèces du genre *Ganoderma* basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : ITS1, 5,8S et ITS 2.

### Liste des tableaux

- Tableau 1. Echantillons d'Indonésie-Missions septembre 2010
- Tableau 2. Liste des échantillons récoltés en Indonésie à Tanah-Gambus en mars 2011.
- Tableau 3. Liste de tous les échantillons étudiés.
- Tableau 4 : Liste des sous-échantillons de la série 1
- Tableau 5. Résultats de quantification de l'ADN total en µg/ml.
- Tableau 6 : Synthèse des résultats BLAST des 247 échantillons

### Liste des annexes

- Annexe 1 : Protocoles mis en place pour l'extraction des ADN totaux
- Annexe 2 : Suivi de la mise en culture des échantillons

<b>I.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>4</b>
1.1.	Objectifs du projet.....	4
1.2.	L'étude réalisée en 2011.....	4
<b>II.</b>	<b>Méthodologie.....</b>	<b>5</b>
2.1.	Matériel biologique.....	5
2.2.	Méthodes.....	10
2.2.1.	Préparation des Milieux de culture.....	10
2.2.2.	Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur .....	10
2.2.3.	Production de mycélium pour les études moléculaires.....	11
2.2.4.	Extraction de l'ADN fongique à l'aide du kit d'extraction Invitrogen .....	11
2.2.5.	Amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire par PCR (Polymerase Chain Reaction) ..	12
2.2.6.	Séquençage.....	13
2.2.7.	Les critères de ressemblance : Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST.....	13
2.2.8.	Constitution d'un fichier de séquences de référence .....	13
<b>III</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>14</b>
3.1.	Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur .....	14
3.2.	Description morphologique de <i>Ganoderma</i> récolté dans les plantations de Tanah- Gambus .....	16
3.3.	Etudes moléculaires.....	16
3.3.1.	Extraction et Purification de l'ADN .....	16
3.3.2.	Analyses des produits d'amplification.....	17
3.3.3.	Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – <i>BLAST</i> .....	18
3.3.4.	Reconstruction d'un arbre phylogénétique de la séquence ribosomique nucléaire 5,8S en ajoutant les ITS2.....	19
<b>IV.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>21</b>
<b>V.</b>	<b>Evolutions du projet et perspectives.....</b>	<b>21</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>23</b>

## Introduction

*Ganoderma boninense*, champignon du sol et agent de la pourriture basale du stipe, dévaste des milliers d'hectares de palmiers à huile en Asie du Sud-est. Il commence à provoquer d'importants dégâts en Afrique centrale et constitue une menace potentielle pour les plantations d'Amérique latine, dont certaines sont déjà atteintes. Le développement de cette menace repose en premier lieu sur le nombre de cycles successifs de culture du palmier à huile sur une même zone.

A ce jour, aucune information n'est disponible sur la diversité et la caractérisation moléculaire de champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile. Ce projet apparaît comme une réponse à ce besoin d'information incontournable sur la biodiversité globale et mondiale de champignons associés au phénomène de dépérissement des palmiers à huile.

Ainsi, il convient de mettre en œuvre la constitution d'une collection de souches de référence de *Ganoderma boninense* basée sur les critères classiques de classification (mise en culture, anatomie, morphologie, etc.) et sur des critères moléculaires (extraction d'ADN, séquençage, phylogénie).

Ce travail consistera à isoler et purifier au laboratoire (culture in vitro sur milieux, en France ou en Indonésie) les champignons responsables des dégradations observées sur le terrain et, également, ceux présents dans le proche environnement (souche forestière, par exemple) ou ceux encore ne provoquant pas de symptômes sur plusieurs années (des palmiers d'aspect sain mais porteurs de carpophores sont repérés en Indonésie).

Ces travaux seront réalisés à partir des champignons en phase active de croissance (carpophore, mycelium). Les souches de cette collection seront maintenues en culture dans les différents laboratoires. La conservation classique par réfrigération, la cryoconservation et la lyophilisation seront évaluées parallèlement par les laboratoires.

### 1.1. Objectifs du projet

Une collection de *Ganoderma boninense*, une fois établie, permettra d'acquérir une meilleure connaissance des principales fonctions impliquées dans le développement, le fonctionnement et l'adaptation à l'environnement des champignons décomposeurs du palmier à huile.

Elle permettra de valider la fiabilité du diagnostic (polymorphisme par exemple lié à l'origine géographique). Elle générera des travaux éclairants et innovants sur l'évolution adaptative des champignons dégradant le stipe du palmier à huile à partir des phylogénies obtenues. Enfin, elle servira à analyser et caractériser « l'agressivité » et « la virulence » des souches.

Ces recherches visent également à l'identification moléculaire d'une espèce fongique sans critère morphologique, c'est-à-dire au premier stade de l'infestation du palmier.

### 1.2. L'étude réalisée en 2011

Les études entreprises au cours de ce travail ont été menées avec des objectifs multiples:

- appréhender la diversité des fructifications fongiques du genre *Ganoderma* dans les plantations de palmier à huile de Tanah-Gambus, et caractériser cette diversité d'un point de vue taxonomique.
- constituer une collection d'isolats fongiques à partir de ces fructifications fongiques et de tissus frais de palmier à huile infesté par *Ganoderma*.
- caractériser les isolats taxonomiquement.



Mais cette étude ne se limitera pas qu'aux observations morphologiques, histologiques et anatomiques des fructifications qui restent incontournables bien qu'elles consomment beaucoup de temps.

Dans notre étude, nous avons choisi de travailler dans la région la plus couramment utilisée pour établir l'identification de souches et les arbres phylogénétiques. Les amorces ITS 1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') spécifiques des champignons ont été choisis dans le cadre de cette analyse taxonomique des espèces étudiées. Ces amorces ont été dessinées pour amplifier la zone comprenant les espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 relativement variables et la petite sous unité ribosomale 5,8 S peu variable (Gardes et Bruns, 1993 ; Schmidt et Moreth, 2000 ; Martin et *al.*, 2002 ; Guerin-Laguet et *al.*, 2003 ; Mitchell et Zuccaro, 2006). Cette étude devra conduire à l'identification et à la discrimination de la plupart de ces espèces de champignons à partir d'une culture pure mycélienne et de palmier à huile contaminé.

En plus des objectifs précédemment énumérés, cette approche taxinomique devrait aboutir à une meilleure connaissance des champignons qui dégradent les palmiers à huile, en particulier le basidiomycète *Ganoderma boninense*.

Les principales étapes pour mener à bien cette étude sont les suivantes :

- 1) Isolement en culture pure et production de mycélium pur à partir de carpophores et de tissus frais de palmier à huile infestés.
- 2) Mise au point des techniques de caractérisation moléculaire : extraction et purification de l'ADN du champignon à partir de mycélium pur; mise au point de l'amplification de l'ADN;
- 3) Analyses des séquences : comparaison des séquences et identification par BLAST et GENBANK.

## II. Méthodologie

### 2.1. Matériel biologique

#### **Echantillons de Tanah Gambus, Indonésie:**

Il y a deux séries :

- **Une première série de 31 échantillons récoltés en septembre 2010 et conservés à -20°C :** 17 sont des carpophores (noté « Ind. »); 1 carpophore issu de la nurserie (noté « Ind.29N » ; 13 sont des morceaux de troncs de palmiers à huile suspectés d'être infectés (noté par des chiffres, exemple « 2.0 » est le premier fragment du tronc n°2 ; voir Figure 1). Il y a **62 sous échantillons troncs**. Cette première série est présentée dans le tableau 1 et dans le tableau 4 pour les sous-échantillons.
- **Une deuxième série de 28 échantillons récoltés en mars 2011 est conservée à 4°C :** 16 sont des carpophores (noté « D. ») ; 12 sont des morceaux de troncs (noté « D. »). Cette deuxième série est présentée dans le tableau 2.

#### **Echantillons du Bénin :**

**Douze** échantillons proviennent du Bénin ; ils sont distingués en trois catégories : en parcelle (noté « P »), au nombre de **5** ; en oleifera (noté « O »), au nombre de **4** ; en Bénin (noté « B »), au nombre de **3**. Cette notation a été choisie en fonction des indications données par les fiches envoyées avec les champignons.

#### **Echantillons analysés en 2010 :**

Des échantillons issus des travaux de 2010 ; 23 tissus de palmier à huile infestés et lyophilisés

n'avaient pas donné de résultats satisfaisant. La nomenclature est celle de l'an dernier.

**Echantillons témoins :**

- **Quatre témoins positifs :** *Ganoderma lucidum* (noté « t (+) G.l »), *Ganoderma athensorii* (noté « t (+) G.a »), et IC 14, un champignon identifié lors de l'étude 2010 et un échantillon NJ3 provenant des récoltes de mars 2010 en Indonésie à Tanah Gambus : c'est un tissu frais de palmier à huile (noté « t (+) NJ3 »).
- **Témoin négatif :** eau millipore (noté « t - »).

Tous ces échantillons sont répertoriés dans le tableau 3.

**Sous-échantillons des troncs de palmier à huile de la récolte de Septembre 2010 :**

Les coupes des tissus de palmier à huile ont été observées à la loupe, et nous avons repéré des zones de couleurs différentes à l'aide de pastilles numérotées (le « 0 » étant attribué à la zone la plus claire) afin de prélever des échantillons de ces zones, pour la réalisation d'une extraction. Ces zones colorées peuvent être potentiellement infestées par le champignon (voir figure 1).

Ici, les couleurs du bois sont numérotées de 0 à 4, de la plus claire à la plus colorée.

Les sous-échantillons étudiés sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 1 : Echantillons d'Indonésie-Missions septembre 2010**

GROUP AGE OF PLANTING YEARS	DAY - 1			DAY - 2		
	BACKHOE LOADER	CHAINSAW	FRUITING BODY	BACKHOE LOADER	CHAINSAW	FRUITING BODY
	BLOCK (PLANTING YEARS)					
<b>0 - 5</b>				27 (2005)		
<b>6 - 10</b>	18 (2001)	13 A (2003)		7 A (2004)		
<b>11 - 15</b>		54 (1999)	23 (1996), 34 (1998), 54 (1999), 55 (1999),	43 (1996), 44 A (1996)	53 A (1997), 59 (1998)	
<b>16 - 20</b>		24 (1990)				41 A (1985), 57 (1986), 62 (1986), 65 (1988), 69 (1989)

**Tableau 2. Liste des échantillons récoltés en Indonésie à Tanah-Gambus los de la mission en mars 2011**, avec le numéro de l'isolat, le descriptif de l'échantillon (carpophore ou tissu frais), le numéro de la parcelle (Block), le numéro du palmier, l'âge et les symptômes des feuilles.

Numéro de l'isolat	Descriptif de l'échantillon	de Block	Numéro de palmier	de Age (an)	Symptôme des feuilles
D1	carpophore	44	7	15	Important
D2	carpophore	44	7	15	Important
D3	carpophore	44	10	15	Important
D4	carpophore	44	4	15	Important
D5	carpophore	44	4	15	Important
D6	carpophore	44	4	15	Important
D7	carpophore	44	4	15	Important
D8	carpophore/moisissure	53	4	14	Léger
D9	carpophore	44	3	15	Léger
D10	carpophore	53	4	14	Important
D11	carpophore	53	1	14	Léger
D12	carpophore	8	5	8	Important
D13	tissu frais	8	5	8	Important
D14	tissu frais	8	5	8	Important
D15	tissu frais	39	1	13	Important
D16	carpophore	39	16	13	Important
D17	tissu frais	39	16	13	Important
D18	tissu frais	39	8	26	?
D19	tissu frais	39	8	26	?
D20	carpophore/moisissure	57	1	25	?
D21	tissu frais	57	1	25	?
D22	tissu frais	57	7	25	?
D23	tissu frais	57	5	25	?
D24	carpophore/moisissure	62	12	25	Léger
D25	tissu frais	62	10	25	Important
D26	carpophore/moisissure	65	3	23	?
D27	tissu frais	65	3	23	?
D28	tissu frais	42 (pathologie labo)	1	14	Léger
NJ 3	Mycélium pur				
NJ3-H1	Mycélium pur				
NJ3-H2	Mycélium pur				

**Tableau 3. Liste de tous les échantillons étudiés.**

Indonésie		Bénin	Indéterminés 2010	témoins
série 1	série 2	B1	I 21	Positifs :
		B2	I 24	<i>G. lucidum</i>
		B3	I 28	<i>G. athensorii</i>
Ind.1	<b>Fructification</b>		I 28	IC 14
2			I 35	NJ3
3	D.1	P1	I 45	
4	D.2	P2	I 47	Négatifs :
Ind.5	D.3	P3	I 60	t (-) avec de l'eau
6	D.4	P4	I 65	millipore
7	D.5	P5		
Ind.8	D.6			
9a	D.7	O1	D II 43 (1)	
9b	D.8	O2	D II 43 (2)	
9c	D.9	O3	D II 43 (3)	
Ind.10	D.10	O4	D II 43 (4)	
Ind.11	D.11		D III 44	
Ind.12	D.12		D III 44 (1)	
Ind.13	D.16		D III 44 (2)	
Ind.14	D.20		D III 53 (2)	
Ind.15	D.24			
Ind.16	D.26		RSSP3B1	
17			H70/11 TSSR	
18			H70/11 TSSR	
19			TSS H/R	
Ind.20			D 511	
21				
22			85200 (3)	
Ind.23			86200 (2)	
Ind.24			86200 (3)	
Ind.25				
Ind.26				
Ind.27				
Ind.28				
Ind.29N	<b>tissu</b>			
	D.13			
	D.14			
	D.15			
	D.17			
	D.18			
	D.19			
	D.21			
	D.22			
	D.23			
	D.25			
	D.27			
	D.28			





**Figure 1 : Photo de tissu de palmier à huile numéro 2 d'Indonésie (série 1)**

**Tableau 4 : liste des sous-échantillons de la série 1**

N° des tissus	Sous-échantillons de la série 1 : le « 0 » étant attribué à la zone la plus claire ;					
	0	1	2	3	4	5
2	X	X	X	X	X	
3	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X			
6	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X
9a	X	X	X	X	X	X
9b	X	X	X	X		
9c	X	X	X	X		
17	X	X	X	X	X	
18	X	X	X	X		
19	X	X	X			
21	X	X	X	X		
22	X	X	X	X	X	X
total	62 sous-échantillons					

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Préparation des Milieux de culture

Les échantillons ont tous été mis en culture dans des boîtes de Pétri, trois milieux de culture différents, à température ambiante (environ 20°C) et à l'obscurité.

Ces trois milieux ont été sélectionnés pour comparer la croissance et la morphologie du mycélium en fonction du milieu :

- WA-CS : (Water-Agar, Chloramphénicol, Streptomycine), inhibe les bactéries et active la croissance du mycélium
- PDA-C : (Potatoe Dextrose Agar, Chloramphénicol) permet l'obtention d'une plus grande quantité de mycélium après récupération du mycélium sur milieu WA-CS
- M-A : (Malt-Agar) permet également l'obtention d'une plus grande quantité de mycélium après récupération du mycélium sur milieu WA-CS

1) milieu WA-CS : Agar : 25g / L ; Eau distillée : 1 L ; Streptomycine : 0,5g / L ; Chloramphénicol : 0,5 g / L. La streptomycine et le chloramphénicol sont des antibiotiques inhibant la croissance des bactéries présentes sur les tissus frais

2) milieu PDA-C : Extrait de pomme de terre à 4g / L ; Glucose 20g / L ; Agar 15g / L ; Chloramphénicol à 0,5g / L. Le glucose et l'amidon présent dans l'extrait de pomme de terre servent de nutriments pour la croissance des champignons, quand à l'antibiotique il sert à inhiber les bactéries.

*Note : L'initial D de « PDA » est pour le dextrose, synonyme de glucose lorsqu'il s'agit de D-glucose.*

3) milieu M-A : 40 g / L de malt ; 20 g / L d'agar. La haute teneur en hydrates de carbone dans le malt accélère la croissance du champignon le pH acide inhibe la croissance des bactéries. C'est pour cela, en partie, que l'on n'ajoute pas d'antibiotique dans le milieu Malt-Agar

### 2.2.2. Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur

Sous hotte stérile, on prélève aseptiquement à l'aide d'un scalpel stérilisé dans un stérilisateur à bille, une partie de l'échantillon de tissus frais et/ou de carpophores en 4 morceaux. Deux de ces morceaux sont stérilisés à l'éthanol 70 %. En effet le fait de stériliser en surface les morceaux permet d'enlever une partie des bactéries présentes. Mais, par précaution, les deux autres morceaux ne sont pas stérilisés afin de ne pas tuer toute la flore fongique. Quatre boîtes de Pétri contenant le milieu WA-CS sont donc utilisées par échantillon. Au total 120 boîtes seront utilisées dans cette première étape d'isolement.

Les cultures sont laissées à incuber à l'obscurité et à une température de 20°C, en ne les amenant à la lumière que pour les examiner.

Elles sont examinées tous les jours pendant 4 semaines (phase active du mycélium). Les examens et l'identification de ces isollements sont réalisés sous la loupe et au microscope optique soit directement dans les boîtes de Pétri ou à l'aide de préparations particulières entre lame et lamelle (au Lugol, au bleu Cotton).

Après avoir obtenu un mycélium recouvrant une partie de la plage de milieu de culture WA-CS, et étant morphologiquement du basidiomycète *Ganoderma* qui a un mycélium blanc, lisse et ras, l'isolement peut se réaliser sur les milieux M-A et PDA-C.

Les cultures sont laissées de nouveau à incuber à l'obscurité et à une température de 20°C, en ne les amenant à la lumière que pour les examiner. Elles sont examinées tous deux jours pendant 6 semaines

Pour chaque échantillon, quatre boîtes de Pétri sont utilisées pour avoir une meilleure chance de réussite pour le repiquage. Et à partir d'une culture en pleine croissance, des repiquages sont réalisés à partir de cubes de 2-3 mm d'arête. Les cultures sont laissées à incuber à l'obscurité et à une température de 20°C. Une surveillance quotidienne est réalisée. A chaque fois qu'il apparaît un développement du mycélium, il faut le repiquer, afin de l'isoler des autres champignons susceptibles de se développer après.

Lorsque la pureté du mycélium est observée, celui-ci est repiqué sur 4 boîtes de Pétri de Malt-Agar puis définitivement entretenue dans deux tubes au réfrigérateur et à l'obscurité.

### **2.2.3. Production de mycélium pour les études moléculaires**

Pour chaque souche pure, le mycélium est cultivé en boîte de Petri sur milieu de culture malt-agar (4%-2%) recouvert d'une feuille de cellophane (Lecellier et Silar, 1994). Après 10 jours de culture à 20°C à l'obscurité, le mycélium est récolté en prenant soin d'éliminer toute trace de milieu de culture, notamment la gélose de l'implant de repiquage. On dispose d'une méthode qui permet d'obtenir un mycélium dépourvu de toute trace de milieu de culture, notamment de gélose. Avant de procéder à l'étape de purification de l'ADN nucléaire, les mycéliums récoltés sont placés dans un tube Eppendorf, congelés dans l'azote liquide puis stockés au congélateur à -80°C. Dans ces conditions, la conservation peut-être envisagée pendant une durée, de l'ordre de quelques années.

### **2.2.4. Extraction de l'ADN fongique à l'aide du kit d'extraction Invitrogen « TM purlink plant total DNA purification kit » et quantification des ADN extraits.**

- **A partir des tissus frais de palmier à huile et des carpophores** : réduire en poudre tous les échantillons avec de l'azote liquide ; leur faire subir un choc thermique et un broyage mécanique ; suivre le protocole pour l'extraction d'InvitroGen avec le kit d'extraction « purlink<sup>TM</sup> plant total DNA purification kit » (Annexe 1).
- **A partir du mycélium pur** : Sous hotte stérile, à l'aide d'un scalpel et d'une pince stérile, ôter le mycélium de la gélose ; le placer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml stérile ; mettre le tube dans de l'azote liquide pendant 2 mn ; ajouter 500 µL de tampon de suspension R2 du kit InvitroGen pour que le mycélium soit bien immergé dans le tampon ; broyer manuellement le mycélium à l'aide d'un pilon stérile dans le tube Eppendorf ; suivre le protocole pour l'extraction établi par InvitroGen avec le kit d'extraction « purlink<sup>TM</sup> plant total DNA purification kit » (Annexe 1).

L'ADN des souches extraites est quantifié par spectrométrie sur le spectrophotomètre Shimadzu. Il mesure la concentration et la pureté de l'ADN extrait avec 2µl d'échantillon. L'indice de pureté est calculé grâce aux rapports des mesures de l'absorbance à 260 et 280 nm. Ce rapport 260/280 doit se rapprocher de 1,8 pour qualifier l'échantillon de pur. Des valeurs plus petites indiqueraient la présence d'impuretés ou de protéines absorbant aux environs des mêmes longueurs d'ondes

### 2.2.5. Amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Un protocole d'amplification adapté aux champignons mycorrhiziens, inspiré par White *et al.* (1990) et mis au point au Laboratoire des Symbiotes des Racines (INRA de Montpellier) a été utilisé.

Les champignons, qui sont des organismes eucaryotes, ne possèdent pas les mêmes ARN ribosomiques que les bactéries qui sont des organismes procaryotes. Ils doivent donc être analysés séparément. Or, l'étude de la diversité par biologie moléculaire est moins répandue chez les eucaryotes, en particulier au niveau des champignons. Le choix des amorces et donc du gène cible à amplifier pour identifier les champignons d'un échantillon environnemental est encore discuté. Cependant l'étude de la région de l'ADN codant pour les sous-unités ribosomiques est aujourd'hui établie. La figure 2 montre de façon schématique l'opéron ribosomique avec les sites des différentes amorces utilisées ou utilisables pour l'étude de l'ADN ribosomique nucléaire.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans des plaques propres de PCR. Le volume réactionnel est le suivante : 4 µl de dNTP ; 10 µl tampon 5X ; 2 µl de chaque amorce (20pmol/µl) : ITS1-myc et ITS4-myc ; 5 µl ADN total extrait (environ 50ng) ; 26,7 µl eau millipore ou stérile (pour compléter à 50µl) ; 0,30 µl Taq polymérase.

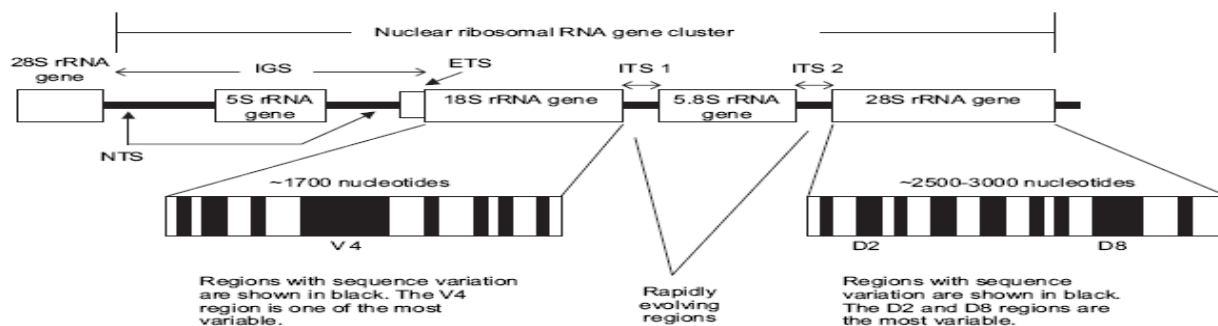
Des témoins sans ADN sont réalisés pour tester la présence d'éventuelles contaminations dans les réactifs et dans les tampons.

Les 50µl du mélange sont ensuite recouverts d'1 goutte d'huile minérale pour éviter les phénomènes d'évaporation et de condensation dans les tubes. La plaque est ensuite recouverte d'un papier adhésif et placée dans un thermocycleur programmé de la façon suivante :

- une phase initiale de dénaturation à 96°C pendant 5 min.
- **30 cycles comprenant** une phase de dénaturation à 96°C pendant 30 sec ; une phase d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes ; puis une phase d'extension à 72°C pendant 1.30min
- allongement de la phase d'extension ou phase finale d'élongation à 72°C pendant 7 min
- conservation du produit d'amplification à 4°C ou congélation à -20°C

Ce protocole permet d'amplifier correctement la région qui nous intéresse; il est toutefois nécessaire de rechercher la concentration en ADN qui permet d'obtenir une réaction d'amplification optimale.

La vérification du bon fonctionnement de la réaction d'amplification est réalisée grâce à la visualisation des amplifiats sur un gel de contrôle. Dix µl d'amplifiats sont déposés sur un gel d'agarose à 0.8% dans un tampon TAE 1X. La migration s'effectue par électrophorèse à 120V pendant une heure.



**Figure 2.** L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes. L'opéron comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5.8S, 18S et 25S ou 28S), et des régions « entre-espaces » entremêlées (IGS – intergenic spacer, NTS – non-transcribed spacer, ETS – externa



### 2.2.6. Séquençage

Les échantillons amplifiés sont envoyés pour le séquençage à la société MacroGen, en Corée du Sud, qui utilise le 3730XL DNA SEQUENCER.

Dans notre étude, après avoir obtenu et corrigé les séquences à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel CHROMAS PLUS nous effectuerons des BLASTn (Nucléotide) sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) pour comparer nos séquences avec celles présentes en banques.

### 2.2.7. Les critères de ressemblance : Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Le BLAST, *Basic Local Alignment and Search Tool*, (Altschul *et al.*, 1997) est une méthode spécialement développée pour confronter une séquence nucléique ou protéique inconnue à l'ensemble de celles que l'on trouve dans les banques nucléiques (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées par hasard. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.*, 1997).

À un alignement donné, est toujours associé un score. Les programmes d'alignement, quels qu'ils soient, cherchent toujours à maximiser ce score. Nous pouvons penser que plus le score est grand, plus l'alignement est significatif. Ce raisonnement est valide si l'on s'intéresse à une famille homogène où toutes les séquences ont à peu près la même longueur : dans ce cas plus le score est élevé, plus la ressemblance est grande, ce qui ne nous dit pas cependant si elle est significative (Risler *et al.*, 2003).

Dans notre étude, plutôt que d'utiliser les scores nous allons utiliser les pourcentages d'identités ou de similarités entre deux séquences et nos critères de vraisemblance seront les suivants : si les séquences les plus proches extraites des banques de données possèdent plus de 90% de similarité et si ces séquences donnent le même nom de genre et d'espèce, le résultat obtenu est conforme à notre identification initiale basée sur les critères morpho-anatomiques pour le genre et pour l'espèce.

### 2.2.8. Constitution d'un fichier de séquences de référence

Lors de la réalisation des BLAST, toutes les séquences de référence proches de nos souches seront extraites des banques de données NCBI. Elles constitueront ainsi une source de séquences de référence, outil essentiel pour les études taxonomiques et phylogénétiques qui seront réalisées en 2012.

### III Résultats

#### 3.1. Isolement : mise en culture, obtention de mycélium pur

La liste des échantillons fongiques qui ont été isolés est présentée dans l'annexe 2. Cette liste présente la référence des isolats, l'origine du substrat, la date de prélèvement et le nombre de repiquages nécessaires pour l'obtention de la souche pure.

Le mycélium attendu de *Ganoderma* lorsque celui-ci croît sur un milieu de culture présente un développement de filaments mycéliens blancs serrés et fins, et légèrement à bords brun orangés (Figure 2 et 3).

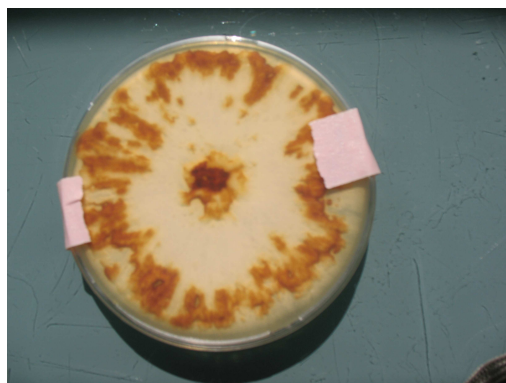
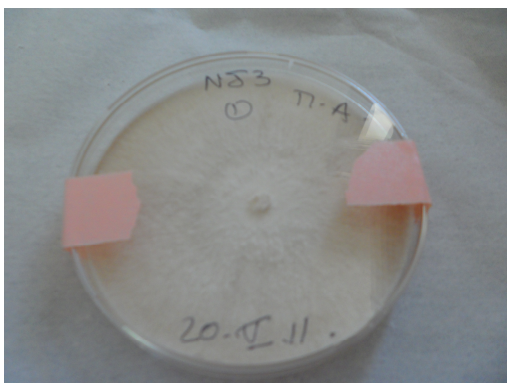
La recherche d'un milieu de culture favorable à la croissance de mycélium s'est avérée nécessaire notamment pour la plupart des échantillons qui montraient des difficultés à croître sur le milieu M.A (Malt Agar), classiquement utilisé au laboratoire. C'est le milieu P.D.A (Malt Dextrose Agar) contenant l'antibiotique streptomycine qui a été retenu.

Cependant, de nombreuses contaminations dans les boîtes de Pétri ont été rencontrées lors de l'isolement. Elles sont causées principalement par la présence de bactéries, de moisissures, d'insectes et d'acariens venant des échantillons. Les contaminants se développent en général en colonies ou en mycélium irradiant le milieu. Souvent, les contaminants suivent l'évolution du mycélium et résistent bien aux antibiotiques. Les insectes et les acariens apportent souvent les moisissures et l'isolement est difficile à obtenir dans ces cas là.

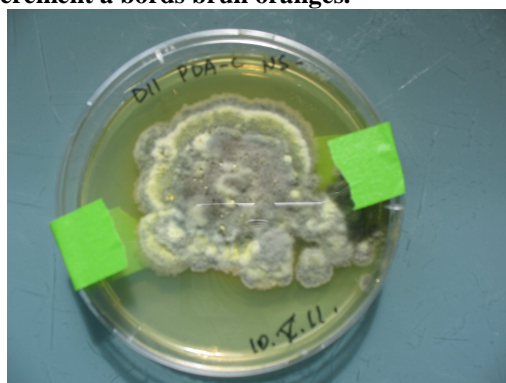
Dans ce contexte un nombre important de contaminations a été observé lors des isolements et des repiquages successifs de ces souches ont été effectuées avant l'obtention d'une souche pure : sur les 30 échantillons présentés dans l'annexe 2, cinq échantillons ont donné un mycélium pur de champignon .

Les principaux contaminants observés montrent des aspects morphologiques différents sur les milieux de culture (Figures 4 et 5):

- milieu de culture envahi de bactéries et de levures : développement gluant, lisse, jaune ou blanc
- développement gluant de coloration rose : *Rhodotorula* sp.
- Léger développement de filaments mycéliens blancs fins floconneux : *Trichoderma* sp.
- Développement de filaments mycéliens de coloration gris noir floconneux : *Botrytis cinerea*
- Développement de filaments mycéliens verts gris : *Penicillium*, *Alternaria tenuis*
- Développement de filaments mycéliens verts foncés : *Alternaria*, *Trichoderma*
- Important développement de filaments mycéliens pourpres avec rougissement du milieu : *Epicoccum purpurescens*, *E.nigrum*, ou *Fusarium* (revers orange)
- Filaments mycéliens blancs rosés à bords noirs : Noir charbon : *Aureobasidium pullulans*
- Développement de filaments mycéliens blancs grisâtres ou d'un monticule de coloration noire : *Cladosporium herbarum*
- Développement blanc sur le bois et la boîte est complètement envahie par *Mucor Bienalis* (strie étoile)



**Figure 3 et 4.** Obtention de mycélium pur de *Ganoderma* pour l'inoculât NJ3 : développement de filaments mycéliens blancs serrés et fins, et légèrement à bords brun orangés.



**Figure 5.** Développement de filaments mycéliens verts gris : *Penicillium*, *Alternaria tenuis*,...



**Figure 6.** Envahissement complet de la boîte : *Mucor bienalis*,...

Il est apparu que ces isollements doivent se faire impérativement dans les 24 heures qui suivent la récolte dans les plantations sinon les échantillons, en particulier les tissus frais de palmier à huile se décomposent très vite. L'exploration d'autres techniques d'isolement seront envisagées pour ce type d'isolement (protocoles de séchage des tissus frais après récolte, préparations d'autres milieux, ajouts d'autres antibiotiques, d'anti acariens dans les milieux de culture, ...).

### 3.2. Description morphologique de *Ganoderma* récolté dans les plantations de Tanah-Gambus

C'est une espèce porée et la trame est colorée. *Ganoderma* est représenté par différentes formes souvent en forme de console semi-circulaires à zones concentriques et est largement fixé au substrat : palmier à huile. Les formes diffèrent entre elles par la longueur ou l'absence du stipe, par l'épaisseur de celui-ci, par la forme et l'épaisseur du chapeau. Le chapeau peut varier de 50 à 200 mm de largeur. Cela peut ressembler à une petite cuiller au bout d'un long manche filiforme, ou au contraire s'épater largement au ras du sol. Ils ont un vernis caractéristique et de belles couleurs brillantes allant de l'orange vif au brun rouille. La marge est en général rouge brique à bord clair orangé. L'hyménium ou couche sporifère est sans cystides. La chair, ou trame, du carpophore est colorée et ligneuse.



Figure 6 et 7. *Ganoderma* dans la pépinière expérimentale et sur un palmier à huile de Tanah-Gambus.

### 3.3. Etudes moléculaires

#### 3.3.1. Extraction et Purification de l'ADN

L'adaptation du protocole du kit Invitrogen au laboratoire a permis une extraction optimale. Ainsi l'ADN de tous les échantillons étudiés a pu être extrait et amplifié.

La concentration et la pureté des ADN totaux extraits ont été évaluées. Les quantités d'ADN obtenues varient en fonction des échantillons : de 0.120 à 110.44  $\mu\text{g/ml}$  et sont présentés dans le tableau 5. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'obtention d'impuretés qui « biaiserait » les mesures effectuées au spectrophotomètre. Dans ce dernier cas, une étape supplémentaire concernant le lavage du culot, lors de l'extraction de l'ADN, devra être envisagée.



**Tableau 5. Résultats de quantification de l'ADN total en µg/ml.**

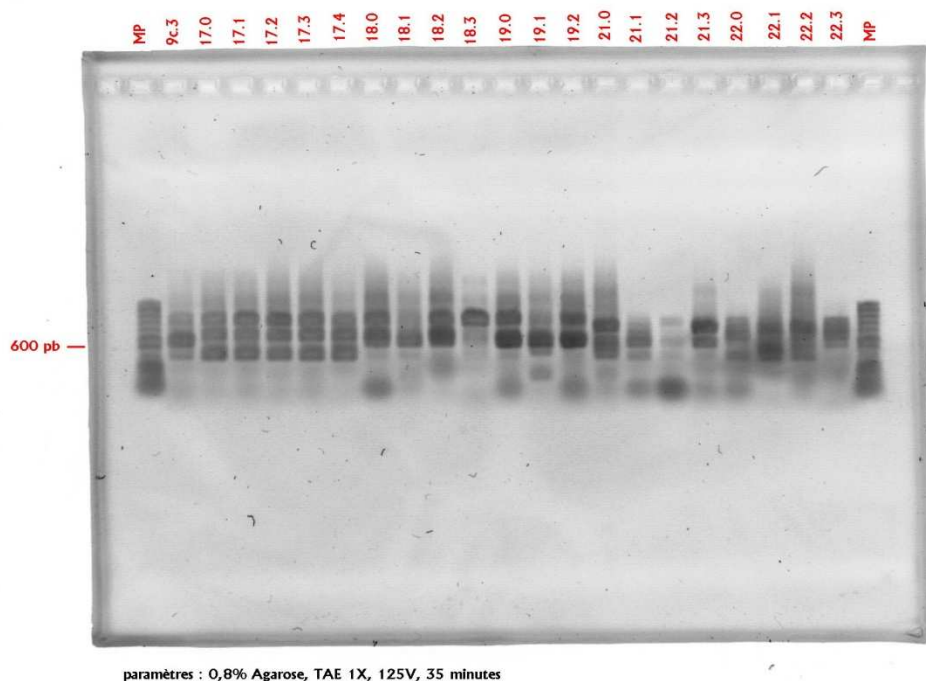
catégorie	valeur maximale	valeur minimale	moyenne	écart type
Carpophore Série 1	110,44	0,244	12,98	13,81
Troncs Série 1	17,3	0,549	4,80	3,88
Duplicate Carpophore Série 1	55,5	2,2	13,01	14,68
Duplicate Troncs Série 1	4,94	0,85	3,03	1,14
Carpophore Série 2	5,43	0,12	2,32	2,14
Troncs Série 2	19,3	0,31	5,86	6,57
Indéterminés 2010	8,667	0,244	3,39	2,55
Equateur	30,92	6,226	13,08	10,94
Echantillons 2010	198,3	1,7	38,52	33,26

### 3.3.2. Analyses des produits d'amplification

On visualise correctement le marqueur de poids moléculaire et une bande nette avec un poids moléculaire d'approximativement 700 paires de bases.

Néanmoins d'autres bandes, autant inférieures que supérieures à 700 paires de bases, sont également visibles. Cela signifierait qu'il y aurait plusieurs espèces fongiques présentes dans les échantillons ou que les amorces choisies ne sont pas assez spécifiques aux espèces fongiques et amplifieraient l'ADN du palmier à huile ainsi que celui de levures, champignons et de bactéries.

- Sur les 148 dépôts sur gels pour la série 1, les échantillons du Bénin et les indéterminés, 40 dépôts présentaient des contaminations, soit 27% des dépôts totaux. Mais ces contaminations peuvent être des artefacts de réplication ou, dans le cas du bois de palmier à huile, l'amplification d'autres champignons. En effet, les bandes supplémentaires étaient aussi visibles que celle à 700 pb (voir Figure 9).
- Sur les 93 dépôts sur les gels pour la série 2, 12 dépôts présentaient des contaminations, soit 11,16 % des dépôts totaux.



**Figure 9 : Produits de PCR du gel n° 09.**

### 3.3.3. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – *BLAST*

En fonction des critères de qualité de l'alignement (E-value, maximum d'identité, couverture, etc.), le choix de la séquence la plus pertinente est réalisé sur les dix premiers résultats issus du *BLAST*, permettant d'identifier les séquences et donc le genre et l'espèce de l'échantillon de palmier à huile infesté, des carpophores et des souches pures.

Le résultat de séquençage est le suivant :

- 17%: genre *Ganoderma* ;
- 41 %: ascomycètes, levures, autres basidiomycètes ;
- 17%: divers (plantes, etc...) ;
- 25% : séquences inexploitables.

L'Annexe 3 présente les résultats *BLAST* des 247 échantillons.

Le Tableau 6 présente une synthèse des 247 résultats.

**Tableau 6 : Synthèse des résultats des 247 échantillons pour des critères de performances du *BLAST* (e-value, % de coverage) très hauts pour les 10 meilleurs résultats.**

Organisme	<i>Ganoderma</i>	Autres champignons que <i>Ganoderma</i>	plante	non cultivable	autre
total	42	103	19	14	7
pourcentage	17,0	41,7	7,69	5,67	2,83

- parmi les **18 carpophores de la série 1**, **5 sont identifiés genre *Ganoderma*** alors que morphologiquement, tous ces échantillons ont été prélevés parce qu'ils appartenaient au genre *Ganoderma*.
- parmi les **23 échantillons non identifiés en 2010**, **21 sont du genre *Ganoderma***. Ce résultat montre que les méthodes d'extraction et d'amplification sont bien adaptées sur des tissus contaminés et lyophilisés de palmier à huile.
- Aucun des fragments de **tissus de la série 1**, n'a eu pour résultat *Ganoderma*. Cette étude réalisée avec des amorces universelles a révélé la présence d'autres basidiomycètes et d'ascomycètes. La présence de ces champignons dans ce type d'échantillons peut s'expliquer soit par des interactions fongiques (compétitives ou non compétitives), soit par des attaques successives dans le temps dues à des variations de conditions environnementales au sein de l'échantillon : l'acheminement des échantillons de tissus frais d'Indonésie en France a été trop long (3 semaines). Désormais des mesures s'imposent pour améliorer la conservation des échantillons. La solution est que les échantillons une fois récoltés seront immédiatement séchés ou congelés sur les sites de récolte.

### 3.3.4. Reconstruction d'un arbre phylogénétique de la séquence ribosomique nucléaire 5,8S en ajoutant les ITS2. (étude préliminaire)

Une première analyse a été effectuée sur toutes les séquences identifiées après BLAST du genre *Ganoderma*.

L'arbre phylogénétique des espèces du genre *Ganoderma* basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : 5,8S et ITS 2 est présenté en Figure 10. Cet arbre montre les relations de parentés entre nos souches du genre *Ganoderma* les plus proches extraites de NCBI. Il présente cinq groupes principaux et distincts :

- 3 groupes d'« indéterminés 2010 » : 2 groupes pour les tissus frais de palmier à huile infestés, et 1 groupe pour les mycéliums purs de *Ganoderma* lyophilisés ;
- 1 groupe des souches du Bénin ;
- 1 groupe des souches de la série 1 d'Indonésie.

Cette première analyse des relations phylogénétiques interspécifiques de *Ganoderma*, basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : 5,8S et ITS 2, met en évidence des clades bien distincts où les espèces tendent à se grouper selon la nature de l'échantillon et l'origine géographique, en particulier les espèces du Bénin et d'Indonésie et les échantillons d'Indonésie lyophilisés.

A ce jour, nous ne pouvons pas conclure sur ces analyses encore trop préliminaires. Les prochaines études auront pour objectif de réaliser des arbres phylogénétiques des espèces du genre *Ganoderma* basées sur la comparaison des séquences d'ADNr : ITS 1, 5,8S, ITS 2 et des ITS entiers afin d'établir les relations de parentés entre nos souches du genre *Ganoderma*.

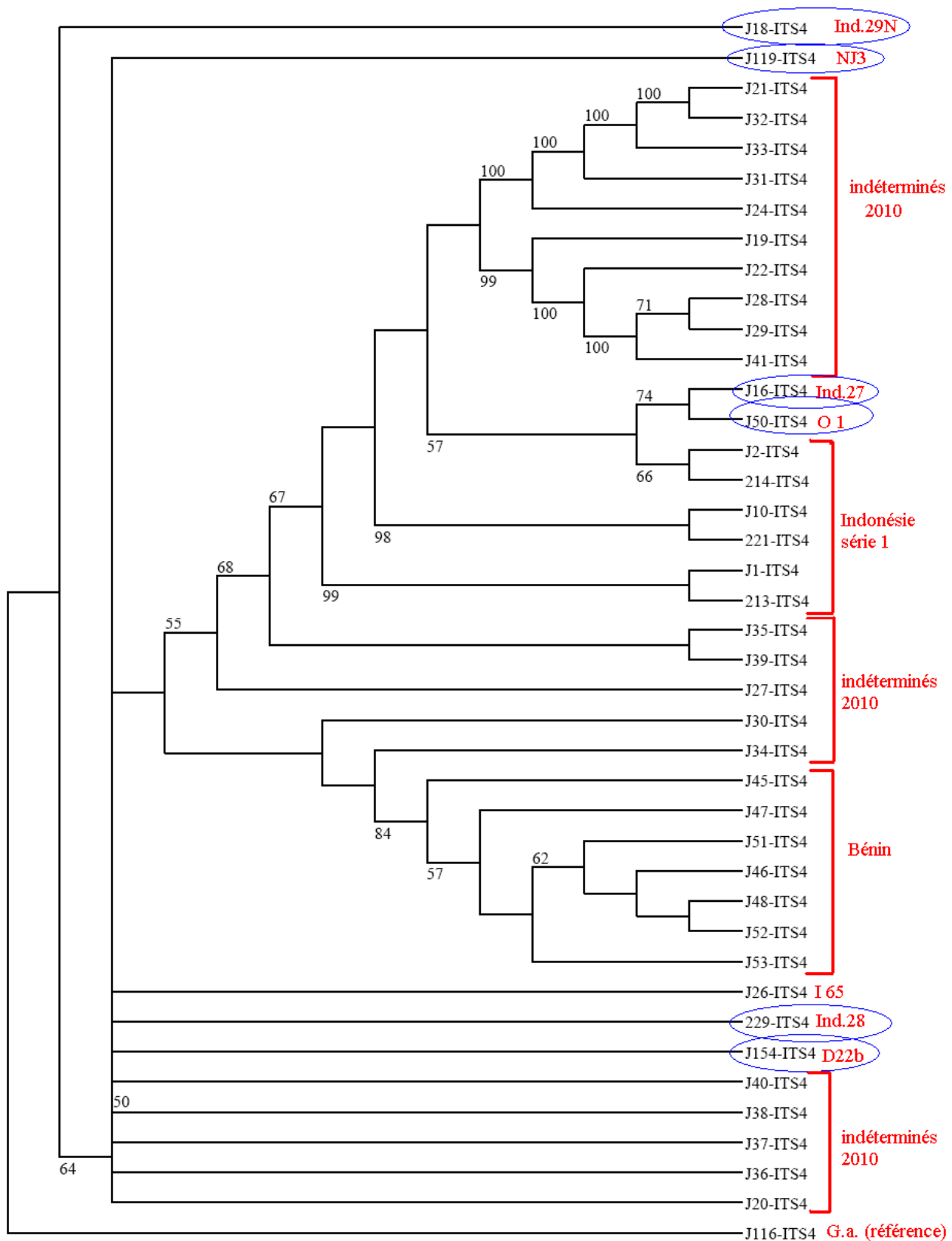


Figure 10. Position phylogénétique d'espèces du genre *Ganoderma* basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : ITS1, 5,8S et ITS 2. L'arbre est construit par Neighbor Joining, avec un rééchantillonnage bootstrap de 1000 répliques (les valeurs de bootstraps sont indiquées aux principaux nœuds de l'arbre).



## IV. Conclusion

- Les méthodes classiques basées sur la description de caractères morphologiques des champignons demeurent incontournables. Cependant, ces méthodes possèdent des limites pour la caractérisation et l'identification de ces champignons, au niveau inter et intraspécifique. Elles ne permettent pas toujours l'identification avec certitude et facilité des cultures mycéliennes de certaines espèces ; elles restent fastidieuses. Il faut compter environ dix semaines pour l'obtention d'un mycélium pur de *Ganoderma*. Dans cette étude 5 isolats parmi les 30 échantillons frais des plantations de Tanah-Gambus (tissus frais infestés et carpophores) semblent être du *Ganoderma boninense*. En général, les souches isolées sont de la classe des Ascomycètes et de celle des Mucorales. Certaines de ces souches ont des vitesses de croissance très rapide (48h) ce qui les rend très envahissantes, comme les genres *Trichoderma* ou *Fusarium*. Le Milieu PDA-Chloramphénicol semble le plus adapté.

- Afin de caractériser les souches qui infestent le palmier à huile, nous avons développé une méthode rapide et discriminante basée sur l'analyse de la diversité de séquences partielles d'ADN ribosomique indépendamment au recours aux caractères morphologiques macro- et microscopiques des sporophores nécessaires à l'identification des genres et espèces. L'adaptation du protocole mis en place au CIRAD, nous a permis d'extraire les ADN de tous nos échantillons à partir de quelques mg de mycélium, de fructifications de *Ganoderma* et de tissus frais de palmier à huile.

- En fonction des critères de qualité de l'alignement (E-value, maximum d'identité, couverture, etc.), le choix de la séquence la plus pertinente est réalisé sur les dix premiers résultats issus du BLAST, permettant d'identifier les séquences et donc le genre et l'espèce du champignon dans l'échantillon. A ce jour, le résultat de séquençage pour 250 échantillons donne un seul nom d'espèce et des critères de performances du BLAST (e-value, % de coverage) très hauts pour les 10 meilleurs résultats. Après BLAST, nous obtenons 17% du genre *Ganoderma* ; 41 % d'ascomycètes, de levures, et d'autres basidiomycètes ; 17% de divers (plantes, etc...) et 25% séquences inexploitables.

- Une première analyse des relations phylogénétiques interspécifiques de *Ganoderma*, basée sur la comparaison des séquences d'ADNr : 5,8S et ITS 2, met en évidence des clades bien distincts où les espèces tendent à se grouper selon la nature de l'échantillon et l'origine géographique, en particulier les espèces du Bénin et d'Indonésie et les échantillons d'Indonésie lyophilisés.

## V. Evolutions du projet et perspectives

La méthode développée dans ce travail sera étendue à l'ensemble de la collection des *Ganoderma* du laboratoire afin de constituer une banque de données des champignons associés au phénomène de dépérissement du palmier à huile. Une telle banque de données est nécessaire au développement d'une méthode de détection précoce et à une identification précise de ces champignons directement dans les tissus de palmier à huile et permettra également de recommander les traitements adaptés pour une meilleure gestion phytosanitaire des plantations de palmier à huile.

Au vu des résultats actuels, la variation chez les ITS1 et ITS2 sera observée au sein du genre *Ganoderma* et des analyses des processus évolutifs vont être abordées.

Des études sur l'intraspecificité du *Ganoderma* prélevé dans les tissus de palmiers provenant d'origine géographique différente (sites, localités), d'âges différents (de 0 à 25 ans), et de

générations différentes vont être également évaluées.

L'exploration d'autres techniques d'isolement seront envisagées pour ce type d'isolement (protocoles de séchage des tissus frais après récolte, préparations d'autres milieux, ajouts d'autres antibiotiques, d'anti acariens dans les milieux de culture, ...).

Les principaux travaux pour 2012 seront les suivants :

- Prospection et Collecte de champignons sur les différents sites de plantations (Afrique, Amérique du sud, Indonésie, etc..) et dans l'environnement proche.
- Analyses culturales: isolement en culture pure, production de mycélium.
- Etudes moléculaires:
  - Caractérisation morphologique, anatomique, écologique, chimique
  - Mises au point des techniques de caractérisations moléculaires.
  - Construction de la banque de données moléculaires
  - Analyse des données, constructions d'arbres phylogénétiques.

Les principaux résultats attendus en 2012 seront les suivants :

- Analyse des données, constructions d'arbres phylogénétiques, interprétation et établissement de la banque de données moléculaires à partir de l'ADN.
- Etudes moléculaires des échantillons du Cameroun, du Libéria, d'autres régions géographiques
- Cartographie d'environ 200 champignons de pays différents si opportunité.

La poursuite de ces travaux devra aboutir aux outils suivants :

- de cartographie et de caractérisation de la biodiversité globale et mondiale des champignons responsables des maladies des palmiers à huile,
- d'étude phylogénétique globale afin d'analyser la corrélation entre les données génétiques et les informations disponibles sur l'origine des souches
- d'aide au diagnostic des champignons responsables des maladies des palmiers à huile,
- de quantification et d'évaluation de l'activité de ces champignons,

## **BIBLIOGRAPHIE**

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. et Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-402.

Gardes M. et Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**:113-118.

Guerin-Laguette, A., Conventi, S., Ruiz, G., Plassard, C., and Mousain, D. 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* **13**: 17-25.

Lecellier G, Silar P (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Current Genetics* **25**: 122-123.

Martin, F., Diez, J., Dell, B., and Delaruelle, C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* **153**: 345-357.

Mitchell J. I. and Zuccaro A. 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, **20** (2): 62-74.

Moreth, U., and Schmidt, O. 2000. Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. *Holzforschung* **54**: 1-8.

Risler J.L., Louis A., Mohsenizadeh S., Brezellec P. et Diaz-Lazcoz Y. 2003. Les comparaisons massives de séquences. Laboratoire Génome et Informatique. Document : 23pp.

Stalpers J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture. *Stud. Mycol. Centraalb. Schimmelcult. Baarn* **16**:1-248.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : PCR Protocols. A guide to methods and applications, Edition Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ Academic press, San Diego, USA, p. 315-322.

## Annexe 1

### Extraction de l'ADN fongique à l'aide du kit d'extraction Invitrogen « TM purlink plant total DNA purification kit »

Les étapes pour la préparation du lysat végétal sont les suivantes :

- Ajouter 250µl de tampon de suspension (R2) qui est à température ambiante.
- Homogénéiser la solution au vortex.
- Ajouter 15 µl de SDS 20% et 15 µl de RNase A (20mg/ml) pour obtenir le lysat.
- Incuber à 55°C pendant 15 minutes pour compléter la lyse.
- Centrifuger le lysat à 10000 rpm pendant 5 minutes pour éliminer le matériel insoluble.
- Transférer le surnageant dans un tube stérile de 1,5ml sans remuer le culot.
- Ajouter 100µl de tampon de précipitation (N2) dans le lysat. Mélanger au vortex et incuber dans de la glace pendant 5 minutes.  
Cette étape permet de précipiter les protéines et les polysaccharides et tous les pigments photosynthétiques liés aux protéines sont également précipités. Les pigments peuvent tâcher les cartouches PurelinkTM et donner un éluat coloré.
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante pour avoir un lysat clair.  
Note : le surnageant doit être clair et non visqueux après cette étape de précipitation.
- Transférer 250µl du lysat dans un tube stérile de 1,5 ml et ajouter au lysat 375µl de tampon de liaison (B4) contenant de l'éthanol. Bien mélanger au vortex.

Procéder à la fixation de l'ADN :

- Transvaser la solution dans une colonne du kit Invitrogen mise sur un tube 2ml fourni dans le kit et centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante.
- Jeter le tube 2 ml avec le filtrat et placer la colonne sur un tube 2 ml propre fourni dans le kit.

Lavage de l'ADN :

- Ajouter dans la colonne 500 µl de tampon de lavage (W4)
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante. Enlever le filtrat et remettre la colonne dans le tube 2 ml.
- Ajouter dans la colonne 500 µl de tampon de lavage (W5) contenant de l'éthanol.
- Centrifuger à 10000 rpm pendant 30 secondes à température ambiante. Enlever le filtrat et remettre la colonne dans le tube 2ml.
- Répéter les étapes 3 et 4 une fois de plus.
- Centrifuger à 15000 rpm pendant 2 minutes pour éliminer tout résidu de tampon de lavage (W5) à température ambiante. Jeter le tube 2 ml.

Procéder à l'élution de l'ADN.

- Placer la colonne dans un tube stérile 1,5 ml.
- Ajouter 100 µl de tampon d'élution (E1) ou de l'eau distillé (pH>7).
- Incuber à température ambiante pendant 1 minute puis centrifuger à 15000 rpm pendant 1 minute. Le tube contient alors l'ADN purifié.
- *En option : pour récupérer plus d'ADN, réaliser une deuxième étape d'élution en utilisant 100 µl de tampon d'élution (E1) ou de l'eau distillée. La deuxième élution peut être effectué en utilisant le même tube d'élution ou dans un tube différent.*
  - Centrifuger la colonne à 15000 rpm pendant 1 minute à température ambiante.

Le tube contient alors l'ADN purifié. Retirer et jeter la colonne.

Les tubes sont ensuite conservés au congélateur à -20°C pour éviter toute dégradation de l'ADN.

Annexe 2 : Tableau du suivi de la mise en culture des échantillons

Référence de l'échantillon	Nature	Mise en culture	Obs. Du 12.IV.11	1 <sup>er</sup> repicage	Obs. du 20.IV.11	2 <sup>ème</sup> repicage 25.IV.11	Obs du 2.V.11	3 <sup>ème</sup> repicage 4.V.11	Obs du 11.V.11	4 <sup>ème</sup> repicage 13.V.11	Obs du 20.V.11	5 <sup>ème</sup> repicage 23.V.11	LE 9.V.11
D 1	carpophore	5.IV.11	Contaminations : 1 / 4	14.IV.11	Conta. : totales								
D 2	carpophore	5.IV.11	Conta. : 2 / 4	14.IV.11	Conta. : totales								
D 3	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 4	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 5	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X		X	Non basid.				
D 6	carpophore	5.IV.11	Conta. : 1 / 4	14.IV.11	Conta. : 3 / 4	X		X	Non basid.				
D 7	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 8	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X		X	Non basid.				
D 9	carpophore	5.IV.2011		14.IV.11	Conta. : 1 / 4	X		X	Non basid.				
D 10	carpophore	5.IV.2011		14.IV.11		X		X	Non basid.				
D 11	carpophore	5.IV.11		14.IV.11		X	Non basid.						
D 12	carpophore	6.IV.11		14.IV.11	Conta. : 2 / 4	X	Non basid.						
D 13	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X		X		X	Non basid.		
D 14	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X	Conta. 2/4	X		X	Non basid.		
D 15	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X		X		X	Non basid.		
D 16	carpophore	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 17	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 18	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X	Semble être du Gano.	X		X		X	Obtention de mycelium de Gano. pur
D 19	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	contas.: 1/4	X		X		X	Non basid.		
D 21	carpophore	6.IV.11		14.IV.11		X		X		X	Semble être du Gano.	X	IDEM
D 22	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11		X	Semble être du Gano.	X		X		X	IDEM
D 23	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	Contas.:2/4	X					Semble être du Gano.	X	IDEM
D 24	carpophore	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 25	Tronc de palmier	6.IV.11		14.IV.11	Non basidyomycete								
D 26	carpophore	6.IV.11		14.IV.11		X	Conta. 1/4	X		X			
D 27	Tronc de palmier	6.IV.11	Conta. : 1/4	14.IV.11	Contas.: 1/4	X	Semble être du Gano.	X		X	Semble être du Gano	X	
D 28		6.IV.11	01-avr	14.IV.11	Contas.:2/4	X							

### Annexe 3 : Liste de tous les résultats après BLAST

N° Macrogen	N° CIRAD	N° accession	Blast	Numéro de parcelle	Age (an)	Symptôme des feuilles
J1	Ind.1	EU701010	<b>Ganoderma boninense</b>	IV	9	Léger
J2	Ind.5	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	IV	9	Léger
J3	Ind.8	AF452119.1	<b>Endothia viridistroma</b>	IV	11	Intermédiaire
J4	Ind.10	FN428887.1	<b>Pichia caribbica</b>	IV	12	Léger
J5	Ind.11	GU318454.1	<b>Ixodes scapularis</b>	IV	12	Léger
J6	Ind.12	FJ499435.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	IV	12	Léger
J7	Ind.13	GU062239.1	<b>Basidiomycota sp.</b>	IV	14	Léger
J8	Ind.14	GU246264.1	<b>Candida savonica</b>	IV	11	Intermédiaire
J9	Ind.15	FJ553376.1	<b>Uncultured Saccharomycetes</b>	IV	11	Léger
J10	Ind.16	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	IV	20	Important
J11	Ind.20	AF444665.1	<b>Bullera sinensis var.</b>	II	5	Léger
J12	Ind.23	HM777040.1	<b>Dipodascus sp.</b>	III	25	Léger
J13	Ind.24	GQ458034.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	III	25	Sain
J14	Ind.25	FJ769426.1	<b>Arxula adeninivorans</b>	III	24	Important
J15	Ind.26	GQ458034.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	III	24	Sain
J16	Ind.27	GU213485.1	<b>Ganoderma lucidum</b>	III	22	Sain
J17	Ind.28	HM210837.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	III	22	Sain
J18	Ind.29N	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué



J19	I21	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J20	I24	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J21	I28	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J22	I35	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J23	I 45	U66449.1 OPU66449	<b>Omphalina philonotis</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J24	I47	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J25	I60	EF042105.1	<b>Phialemonium cf. curvatum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J26	I65	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J27	DII 43(1)	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J28	DII 43(2)	FJ655465.1	<b>Ganoderma australe</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J29	DII 43(3)	AB509645.1	<b>Ganoderma mastoporum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J30	DII 43(4)	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J31	DIII 44	EU841913.1	<b>Ganoderma boninense</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J32	DIII 44(1)	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J33	DIII 44(2)	165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J34	DIII 53(2)	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J35	RSSP3B1	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J36	H70/11 TSSR	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J37	TSS H/R	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J38	D511	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué

J39	85200 (3)	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J40	86200 (2)	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J41	86200 (3)	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J42	B1	gi 229614562 FM202496.1	<b>Physisporinus vitreus</b>	203 C	non communiqué	non communiqué
J43	B2	gi 229614562 FM202496.1	<b>Physisporinus vitreus</b>	203 C	non communiqué	non communiqué
J44	B3	gi 229614562 FM202496.1	<b>Physisporinus vitreus</b>	203 C	non communiqué	non communiqué
J45	P1	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J46	P2	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J47	P3	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J48	P4	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J49	P5	gi 326486745 HQ596918.1	<b>Penicillium citrinum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J50	O1	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J51	O2	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J52	O3	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J53	O4	gi 165941430 EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J54	2_0	gi 297373280 FN428941.1	<b>Pichia caribbica</b>	IV	9	Léger
J55	2_1	gi 157326094 EU135909.1	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger
J56	2_2	gi 157326092 EU135907.1	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger
J57	2_3	gi 157326092 EU135907.1	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger
J58	2_4	gi 157326092 EU135907.1	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger

J59	3_0	<a href="#">gi 223006697 FJ623625.1</a>	<b>Candida blattae</b>	IV	9	Léger
J60	3_1	<a href="#">gi 157326092 EU135907.1</a>	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger
J61	3_2	<a href="#">gi 157326092 EU135907.1</a>	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger
J62	3_3	<a href="#">gi 209973589 EU798698.1</a>	<b>Issatchenkia orientalis</b>	IV	9	Léger
J63	3_4	<a href="#">gi 227345088 FJ875119.1</a>	<b>Rhizomucor variabilis</b>	IV	9	Léger
J64	3_5	<a href="#">gi 297373226 FN428887.1</a>	<b>Pichia caribbica</b>	IV	9	Léger
J65	4_0	<a href="#">gi 157326092 EU135907.1</a>	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger
J66	4_1	<a href="#">gi 223006697 FJ623625.1</a>	<b>Candida blattae</b>	IV	9	Léger
J67	4_2	<a href="#">gi 223006697 FJ623625.1</a>	<b>Candida blattae</b>	IV	9	Léger
J68	6_0	<a href="#">gi 223006697 FJ623625.1</a>	<b>Candida blattae</b>	IV	9	Léger
J69	6_1	<a href="#">gi 74039678 AC165263.2</a>	<b>Mus musculus</b>	IV	9	Léger
J70	6_2	<a href="#">gi 4186095 Y18134.1</a>	<b>Squalus acanthia</b>	IV	9	Léger
J71	6_3	<a href="#">gi 157326094 EU135909.1</a>	<b>Gastrodia elata</b>	IV	9	Léger
J72	6_4	<a href="#">gi 251815167 FM199972.1</a>	<b>Issatchenkia orientalis</b>	IV	9	Léger
J73	6_5	<a href="#">gi 223006697 FJ623625.1</a>	<b>Candida blattae</b>	IV	9	Léger
J74	7_0	<a href="#">gi 21666828 AF455401.1</a>	<b>Issatchenkia orientalis</b>	IV	9	Léger
J75	7_1	<a href="#">gi 223006697 FJ623625.1</a>	<b>Candida blattae</b>	IV	9	Léger
J76	7_2	<a href="#">gi 223006697 FJ623625.1</a>	<b>Candida blattae</b>	IV	9	Léger
J77	7_3	<a href="#">gi 296170886 FN393999.1</a>	<b>Wickerhamomyces anomalus</b>	IV	9	Léger
J78	7_4	<a href="#">FM199972.1</a>	<b>Issatchenkia orientalis</b>	IV	9	Léger

J79	7_5	gi 329011676 HQ379158.1	<b>Hanseniaspora occidentalis</b>	IV	9	Léger
J80	9a_0	gi 327422174 JF736843.1	<b>Candida albicans</b>	IV	11	Intermédiaire
J81	9a_1	0	0	IV	11	Intermédiaire
J82	9a_2	gi 329011683 HQ857740.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	11	Intermédiaire
J83	9a_3	gi 330470885 HQ448930.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	11	Intermédiaire
J84	9a_4	gi 329011685 HQ857742.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	11	Intermédiaire
J85	9a_5	gi 329011685 HQ857742.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	11	Intermédiaire
J86	9b_0	gi 327422174 JF736843.1	<b>Candida albicans</b>	IV	11	Intermédiaire
J87	9b_1	gi 327422174 JF736843.1	<b>Candida albicans</b>	IV	11	Intermédiaire
J88	9b_2	gi 330470885 HQ448930.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	11	Intermédiaire
J89	9b_3	gi 329011684 HQ857741.1	<b>Metschnikowia pulcherrima</b>	IV	11	Intermédiaire
J90	9c_0	gi 330470885 HQ448930.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	11	Intermédiaire
J91	9c_1	gi 327412593 FR820639.1	<b>Candida dubliniensis</b>	IV	11	Intermédiaire
J92	9c_2	EU135909.1	<b>Gastrodia elata</b>	IV	11	Intermédiaire
J93	9c_3	gi 327412593 FR820639.1	<b>Candida dubliniensis</b>	IV	11	Intermédiaire
J94	17_0	gi 329011685 HQ857742.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	20	Léger
J95	17_1	gi 329011685 HQ857742.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	20	Léger
J96	17_2	gi 329011685 HQ857742.1	<b>Meyerozyma guilliermondii</b>	IV	20	Léger
J97	17_3	EU568999.1	<b>Pichia caribbica</b>	IV	20	Léger
J98	17_4	0	0	IV	20	Léger

J99	18_0	0	0	IV	20	Sain
J100	18_1	0	0	IV	20	Sain
J101	18_2	0	0	IV	20	Sain
J102	18_3	HQ265521.1	Elaeis oleifera 18S	IV	20	Sain
J103	19_0	HM231275.1	Candida tropicalis	IV	20	Sain
J104	19_1	HQ014734.1	Candida tropicalis	IV	20	Sain
J105	19_2	HQ014734.1	Candida tropicalis	IV	20	Sain
J106	21_0	0	0	II	5	Léger
J107	21_1	0	0	II	5	Léger
J108	21_2	0	0	II	5	Léger
J109	21_3	EU135909.1	Gastrodia elata	II	5	Léger
J110	22_0	0	0	II	5	Léger
J111	22_1	0	0	II	5	Léger
J112	22_2	0	0	II	5	Léger
J113	22_3	0	0	II	5	Léger
J114	22_4	0	0	II	5	Léger
J115	22_5	0	0	II	5	Léger
J116	G. a. (+)	GU731557.1	Ganoderma carnosum	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J117	G. l. (+)	gi 330896825 HQ607428.1	Streptomyces chartreusis	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J118	I 14 (+)	gi 330470885 HQ448930.1	Meyerozyma guilliermondii	non communiqué	non communiqué	non communiqué

J119	T (+) NJ3	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J120	D1	0	0	III	15	Important
J121	D2	0	0	III	15	Important
J122	D3	0	0	III	15	Important
J123	D4	0	0	III	15	Important
J160	D5	0	0	III	15	Important
J161	D6	0	0	III	15	Important
J124	D7	FN424104.1	<b>Candida sojae</b>	III	15	Important
J125	D8	0	0	III	14	Léger
J162	D9	0	0	III	15	Léger
J163	D10	0	0	III	14	Important
J164	D11	0	0	III	14	Léger
J165	D12	0	0	II	8	Important
J126	D13b	HQ398237.1	<b>Candida tropicalis</b>	II	8	Important
J127	D14b	HQ398237.1	<b>Candida tropicalis</b>	II	8	Important
J128	D15b	0	0	II	13	Important
J129	D16	FJ623625.1	<b>Candida blattae</b>	II	13	Important
J130	D17b	0	0	II	13	Important
J131	D18b	0	0	II	26	?
J132	D19b	0	0	II	26	?



J166	D20	0	0	III	25	?
J133	D21b	0	0	III	25	?
J134	D22b	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	III	25	?
J135	D23b	0	0	III	25	?
J167	D24	0	0	III	25	Léger
J136	D25b	0	0	III	25	Important
J168	D26	0	0	III	23	?
J137	D27b	0	0	III	23	?
J138	D28b	0	0	III	14	Léger
J139	NJ13b	0	0	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J140	D1	0	0	III	15	Important
J141	D2	EF197951.1	<b>Pichia guilliermondii</b>	III	15	Important
J142	D3	0	0	III	15	Important
J143	D4	0	0	III	15	Important
J169	D5	0	0	III	15	Important
J170	D6	0	0	III	15	Important
J144	D7	GU478316.1	<b>Pichia guilliermondii</b>	III	15	Important
J145	D8	0	0	III	14	Léger
J171	D9	0	0	III	15	Léger
J172	D10	0	0	III	14	Important

J173	D11	0	0	III	14	Léger
J174	D12	0	0	II	8	Important
J146	D13b	0	0	II	8	Important
J147	D14b	FN424104.1	Candida sojae	II	8	Important
J148	D15b	0	0	II	13	Important
J149	D16	0	0	II	13	Important
J150	D17b	0	0	II	13	Important
J151	D18b	0	0	II	26	?
J152	D19b	0	0	II	26	?
J175	D20	0	0	III	25	?
J153	D21b	0	0	III	25	?
J154	D22b	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	III	25	?
J155	D23b	EF197951.1	Pichia guilliermondii	III	25	?
J176	D24	0	0	III	25	Léger
J156	D25b	0	0	III	25	Important
J177	D26	0	0	III	23	?
J157	D27b	0	0	III	23	?
J158	D28b	0	0	III	14	Léger
J159	NJ13b	0	0	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J178	Ind.1	EU918695.1	Ganoderma gibbosum	IV	9	Léger

J179	Ind.5	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	IV	9	Léger
J180	Ind.8	gi 332384187 JF705212.1	<b>Thanatephorus cucumeris</b>	IV	11	Intermédiaire
J181	Ind.10	HQ693781.1	<b>Meyerozyma caribbica</b>	IV	12	Léger
J182	Ind.11	gi 332656411 CP002687.1	<b>Arabidopsis thaliana</b>	IV	12	Léger
J183	Ind.12	DQ286062.1	<b>Galactomyces sp.</b>	IV	12	Léger
J184	Ind.13	AY575919.1	<b>Anamika angustilamellata</b>	IV	14	Léger
J185	Ind.14			IV	11	Intermédiaire
J186	Ind.15	EU486458.1	<b>Ganoderma carnosum</b>	IV	11	Léger
J187	Ind.16	AM470532.2	<b>Vitis vinifera</b>	IV	20	Important
J188	Ind.20	GQ458034.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	II	5	Léger
J189	Ind.23	GQ458034.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	III	25	Léger
J190	Ind.24	FM178321.1	<b>Arxula adeninivorans</b>	III	25	Sain
J191	Ind.25	GQ458034.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	III	24	Important
J192	Ind.26	FJ623599.1	<b>Candida bolitothori</b>	III	24	Sain
J193	Ind.27	FN597573.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	III	22	Sain
J194	Ind.28	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	III	22	Sain
J195	Ind.29N	AB220245.1	<b>Arthrinium urticae</b>	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J196	Ind.18	0	0	IV	20	Sain
J197	Ind.19	EU135909.1	<b>Gastrodia elata</b>	IV	20	Sain
J198	Ind.22	FN428931.1	<b>Pichia caribbica</b>	II	5	Léger

J199	Ind.17	EU100744.1	<b>Candida akabanensis</b>	IV	20	Léger
J200	Ind.7	AM158923.1	<b>Candida fukuyamaensis</b>	IV	9	Léger
J201	Ind.3	HQ248205.1	<b>Ceratocystis paradoxa</b>	IV	9	Léger
J202	Ind.4	AM408412.1	<b>Caloplaca arnoldii</b>	IV	9	Léger
J203	Ind.9a	EU100744.1	<b>Candida akabanensis</b>	IV	11	Intermédiaire
J204	Ind.9b	EU135909.1	<b>Gastrodia elata</b>	IV	11	Intermédiaire
J205	Ind.2	FN547681.1	<b>Glomus versiforme</b>	IV	9	Léger
J206	Ind.21	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	II	5	Léger
J207	Ind.14 (carpop)	0	0	0	0	0
J208	06-022	0	0	0	0	0
J209	06-305	0	0	0	0	0
J210	Ind.9c	0	0	0	0	0
J211	06-022b	0	0	0	0	0
J212	06-169	0	0	0	0	0
J213	Ind.1	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	IV	9	Léger
J214	Ind.5	EU239386.1	<b>Ganoderma aff. steyaertanum</b>	IV	9	Léger
J215	Ind.8	EF568082.1	<b>Trichomonascus ciferrii</b>	IV	11	Intermédiaire
J216	Ind.10	FN428887.1	<b>Pichia caribbica</b>	IV	12	Léger
J217	Ind.11	EF381555.1	<b>Uncultured leaf litter fungus</b>	IV	12	Léger
J218	Ind.12	DQ683114.1	<b>Galactomyces geotrichum</b>	IV	12	Léger

J219	Ind.13	FJ717463.1	Panagrolaimus paetzoldi	IV	14	Léger
J220	Ind.14	gi 332648408 JF895463.1	Fomitiporia aethiopica	IV	11	Intermédiaire
J221	Ind.15	EU239386.1	Ganoderma aff. steyaertanum	IV	11	Léger
J222	Ind.16	0	0	IV	20	Important
J223	Ind.20	DQ683114.1	Galactomyces geotrichum	II	5	Léger
J224	Ind.23	0	0	III	25	Léger
J225	Ind.24	EF568082.1	Trichomonascus ciferrii	III	25	Sain
J226	Ind.25	GQ458034.1	Galactomyces geotrichum	III	24	Important
J227	Ind.26	FJ623600.1	Candida atakaporum	III	24	Sain
J228	Ind.27	AJ279445.1	Galactomyces geotrichum	III	22	Sain
J229	Ind.28	GU213486.1	Ganoderma mastoporum	III	22	Sain
J230	Ind.29N	EF192229.1	Candida tropicalis	non communiqué	non communiqué	non communiqué
J231	Ind.19	EF197945.1	Candida boidinii	IV	20	Sain
J232	Ind.22	EF197810.1	Candida carphophila	IV	20	Sain
J233	Ind.17	FJ623625.1	Candida blattae	II	5	Léger
J234	Ind.17	EU100744.1	Candida akabanensis	IV	20	Léger
J235	Ind.7	EF197951.1	Pichia guilliermondii	IV	9	Léger
J236	Ind.3	HQ248205.1	Ceratocystis paradoxa	IV	9	Léger
J237	Ind.4	DQ207898.1	Prionolejeunea aemula	IV	9	Léger
J238	Ind.9a	FJ623625.1	Candida blattae	IV	11	Intermédiaire

J239	Ind.9b	EU135907.1	Gastrodia elata	IV	11	Intermédiaire
J240	Ind.2	AF122018.1	Steinernema neocurtillae	IV	9	Léger
J241	Ind.21	0	0	II	5	Léger
J242	Ind.14 (carpop)	0	0	0	0	0
J243	06-022	0	0	0	0	0
J244	06-305	FJ623624.1	Candida dosseyi	0	0	0
J245	Ind.9c	FJ623625.1	Candida blattae	0	0	0
J246	06-022b	AJ496278.1	Legionella pneumophila	0	0	0
J247	06-169	NM_001043540.1	Bombyx mori	0	0	0